

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/46148 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07C 311/39, C07D 213/42, 307/52, 333/20, A61K 31/18, A61P 9/10, 25/28, 35/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/13681**

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. November 2001 (24.11.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
100 60 809.4 7. Dezember 2000 (07.12.2000) DE

(71) Anmelder: **AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt (DE).**

(72) Erfinder: **WEICHERT, Andreas; Leipziger Strasse 21, 63329 Egelsbach (DE). JANSEN, Hans-Willi; Distelweg 25, 65527 Niedernhausen (DE). KLEEMANN, Heinz-Werner; Mainstrasse 29, 65474 Bischofsheim (DE). LANG, Hans-Jochen; Rüdesheimer Strasse 7, 65719 Hofheim (DE). RÜTTEN, Hartmut; Falkenweg 25, 65510 Idstein (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SUBSTITUTED ANTHRANILIC ACIDS

(54) Bezeichnung: SUBSTITUIERTE ANTHRANILSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to anthranilic acids of formula (I) wherein the substituents R1-R3 have the designations cited in the claims. Said acids have no unwanted and detrimental salidiuretic properties, but rather very good cardioprotective properties, for example in terms of oxygen deficiency phenomena. Due to their pharmacological properties, said acids are highly suitable as cardioprotective pharmaceuticals for the prophylaxis and treatment of infarction, as well as the treatment of angina pectoris, also preventively inhibiting or strongly reducing the pathophysiological processes in the case of disorders caused by ischaemia. The protective action of the inventive compounds of formula (I) against pathological, hypoxic and ischaemic situations, and the inhibition of the cellular Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter (NBC), enables said compounds to be used as pharmaceuticals for treating all acute or chronic disorders caused by ischaemia, or diseases induced in a primary or secondary manner by said disorders.

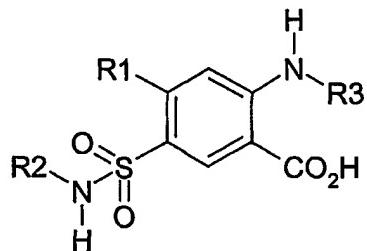
(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Anthranilsäure der Formel (I) worin die Substituenten R1-R3 die in den Ansprüchen angegebenen Bedeutungen haben. Sie haben keine unerwünschten und nachteiligen salidiuretischen, jedoch sehr gute cardioprotektive Eigenschaften, beispielsweise bei Sauerstoffmangelerscheinungen. Sie sind infolge ihrer pharmakologischen Eigenschaften als cardioprotektive Arzneimittel zur Infarktprophylaxe und der Infarktbehandlung sowie zur Behandlung der angina pectoris hervorragend geeignet, wobei sie auch präventiv die pathophysiologischen Vorgänge beim Entstehen ischämisch induzierter Schaden inhibieren oder stark vermindern. Wegen ihrer schützenden Wirkungen gegen pathologische hypoxische und ischämische Situationen können die erfundungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) infolge Inhibition des zellulären Na⁺/HCO₃⁻-Cotransporters (NBC) als Arzneimittel zur Behandlung aller akuten oder chronischen durch Ischämie ausgelösten Schaden oder dadurch primär oder sekundär induzierten Krankheiten verwendet werden.

WO 02/46148 A1

SUBSTITUIERTE ANTHRANILSÄUREN

- Substituierte Anthranilsäuren, ihre Verwendung als Medikament oder Diagnostikum,
 5 sowie sie enthaltendes Medikament, sowie ein pharmazeutisches
 Kombinationspräparat mit einem Natrium/Wasserstoff-Austausch (NHE)-Blocker

Die Erfindung betrifft Anthranilsäuren der Formel I



10 worin bedeuten:

R(1) H, Cl, Br, I, CN, (C₁-C₈)- Alkyl, (C₃-C₆)- Cycloalkyl oder Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, (C₁-C₃)- Alkyl, Methoxy oder -(CF₂)_a-CF₃;

15 a Null, 1, 2 oder 3;

R(2) (C₁-C₈)- Alkyl, -C_bH_{2b}- (C₃-C₆)- Cycloalkyl, -C_bH_{2b}- Phenyl, -C_bH_{2b}- Pyridinyl, -C_bH_{2b}- Thiophenyl, -C_bH_{2b}- Furanyl,

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl, Methoxy oder -SO₂NR(4)R(5);

R(4) und R(5) unabhängig voneinander H, (C₁-C₄)-Alkyl,

20 b Null, 1, 2, 3 oder 4;

R(3) -C_dH_{2d}- Phenyl,

- 2
- wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;
- d 3 oder 4;
- 5 sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, in denen bedeuten:

- R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl,
- wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;
- 10 R(2) (C₁-C₄)- Alkyl, -C_bH_{2b}- Cyclohexyl, -C_bH_{2b}- Phenyl, -C_bH_{2b}- Pyridinyl, -C_bH_{2b}- Thiophenyl, -C_bH_{2b}- Furanyl,
- wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl, Methoxy oder -SO₂NH₂;
- 15 b Null, 1 oder 2;
- R(3) -n-C₄H₈- Phenyl,
- wobei das Phenyl unsubstituiert ist oder substituiert mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;
- 20 sowie deren pharmazeutische verträgliche Salze.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, in denen bedeuten:

- 25 R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl,
- wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

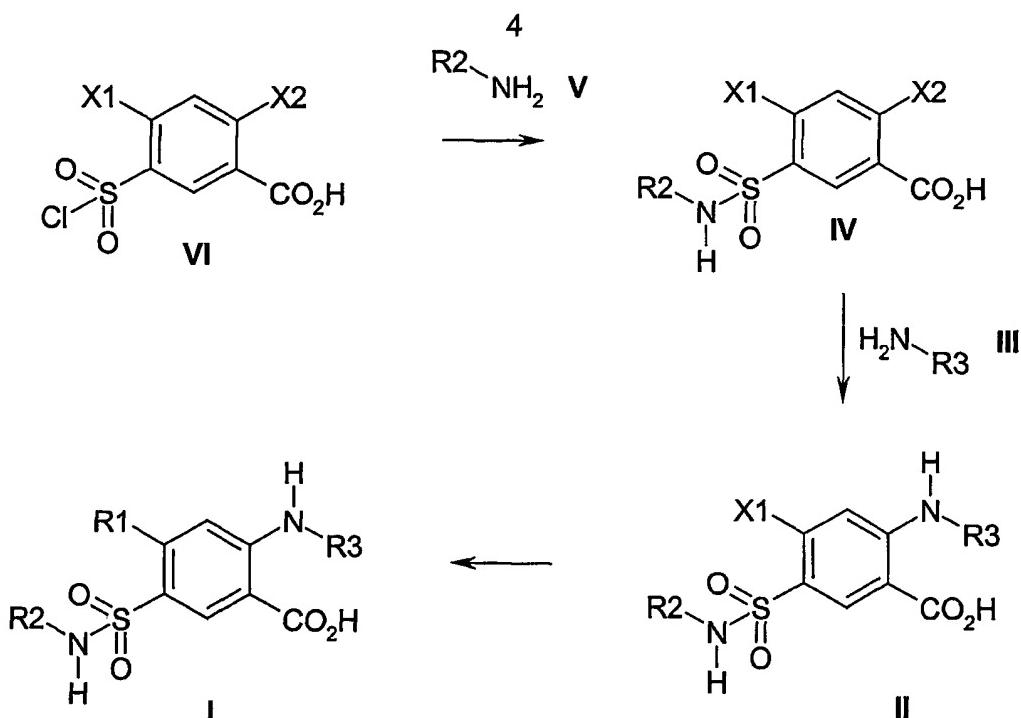
3

R(2) (C_1 - C_4)- Alkyl, - C_bH_{2b} - Cyclohexyl, - C_bH_{2b} - Phenyl, - C_bH_{2b} - Pyridinyl, - C_bH_{2b} - Thiophenyl, - C_bH_{2b} - Furanyl,
wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind
mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
5 F, Cl, CF_3 , (C_1 - C_3)- Alkyl, Methoxy oder $-SO_2NH_2$;
b 1;
R(3) - $n-C_4H_8$ - Phenyl,
sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

10 Ganz besonders bevorzugt ist die Verbindung
4- Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure,
sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze.

15 Enthält einer der Substituenten R(1) bis R(5) ein oder mehrere Asymmetriezentren,
so können diese sowohl S als auch R konfiguriert sein. Die Verbindungen können
als optische Isomere, als Diastereomere, als Racemate oder als Gemische
derselben vorliegen.

Die bezeichneten Alkylreste können sowohl geradkettig wie verzweigt vorliegen.
20 Verbindungen der Formel I lassen sich durch den Fachmann nach aus der Literatur
bekannten Verfahren synthetisieren.



Als mögliche Fluchtgruppen X2 (Formel VI) in der nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktion mit Aminen III können Fluor oder Chlor in Betracht gezogen

5 werden.

Die Einführung einiger Substituenten in 4-Stellung von Zwischenprodukt II (X1 gleich Brom, Iod oder $-\text{O-SO}_2\text{CF}_3$) gelingt durch ebenfalls literaturbekannte Methoden des Palladium-vermittelten cross-couplings von Arylhalogeniden bzw. Aryltriflaten mit beispielsweise Organostannanen, Organoboronsäuren oder Organoboranen oder

10 Organokupfer- bzw. zinkverbindungen.

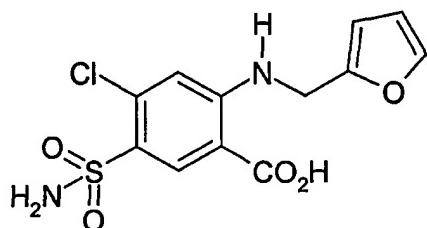
Anthraniolsäuren I sind im allgemeinen schwache Säuren, die Basen unter Bildung von Salzen binden. Als Baseadditionsprodukte kommen alle pharmakologisch verträglichen Salze infrage, beispielsweise Alkalosalze, Lysinate und Tris-

15 (hydroxymethyl)-methylamin-Salze.

Die Verbindungen I sind substituierte Anthraniolsäuren.

5

Ein prominenter Vertreter der Anthranilsäureklasse ist das Furfurylderivat Furosemid, das als Diuretikum in der Therapie Verwendung findet. Furosemid inhibiert den Natrium/Kalium/2Chlor-Cotransporter im aufsteigenden Ast der Henleschen-Schleife in der Niere.



Furosemid

5

In der DE 18 02 208 werden strukturell ähnliche Anthranilsäuren beschrieben, die jedoch an R3 ausschließlich Benzyl-, Furfuryl- oder Thienylsubstituenten tragen und diuretische Wirkung besitzen. Im US-Patent 3 565 920 werden Anthranilsäuren beansprucht, die strukturell mit den Verbindungen der Formel I verwandt sind, sich aber ebenfalls durch eine starke salidiuretische Wirksamkeit auszeichnen.

Es war daher überraschend, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen keine unerwünschten und nachteiligen salidiuretischen, jedoch sehr gute cardioprotektive Eigenschaften aufweisen, beispielsweise bei Sauerstoffmangelerscheinungen. Die 15 Verbindungen sind infolge ihrer pharmakologischen Eigenschaften als cardioprotektive Arzneimittel zur Infarktprophylaxe und der Infarktbehandlung sowie zur Behandlung der angina pectoris hervorragend geeignet, wobei sie auch präventiv die pathophysiologischen Vorgänge beim Entstehen ischämisch induzierter Schäden inhibieren oder stark vermindern. Wegen ihrer schützenden Wirkungen 20 gegen pathologische hypoxische und ischämische Situationen können die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I infolge Inhibition des zellulären Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporters (NBC) als Arzneimittel zur Behandlung aller akuten oder chronischen durch Ischämie ausgelösten Schäden oder dadurch primär oder

6

sekundär induzierten Krankheiten verwendet werden. Dies betrifft ihre Verwendung als Arzneimittel für operative Eingriffe, z. B. bei Organ-Transplantationen, wobei die Verbindungen sowohl für den Schutz der Organe im Spender vor und während der Entnahme, zum Schutz entnommener Organe beispielsweise bei Behandlung mit oder deren Lagerung in physiologischen Badflüssigkeiten, wie auch bei der Überführung in den Empfängerorganismus verwendet werden können. Die Verbindungen sind ebenfalls wertvolle, protektiv wirkende Arzneimittel bei der Durchführung angioplastischer operativer Eingriffe beispielsweise am Herzen wie auch an peripheren Gefäßen. Darüber hinaus reduzieren die erfindungsgemäßen Verbindungen die Entstehung bzw. das Ausmaß einer Herzinsuffizienz nach verschiedenen Insulten. Entsprechend ihrer protektiven Wirkung gegen ischämisch induzierte Schäden sind die Verbindungen auch als Arzneimittel zur Behandlung von Ischämien des Nervensystems, insbesondere des ZNS, geeignet, wobei sie z.B. zur Behandlung des Schlaganfalls oder des Hirnödems geeignet sind. Darüber hinaus eignen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I ebenfalls zur Behandlung von Formen des Schocks, wie beispielweise des allergischen, cardiogenen, hypovolämischen und des bakteriellen Schocks.

Darüber hinaus zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I durch starke inhibierende Wirkung auf die Proliferationen von Zellen, beispielsweise der Fibroblasten- Zellproliferation und der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, aus. Deshalb kommen die Verbindungen der Formel I als wertvolle Therapeutika für Krankheiten infrage, bei denen die Zellproliferation eine primäre oder sekundäre Ursache darstellt, und können deshalb als Antiatherosklerotika, Mittel gegen diabetische Spätkomplikationen, Krebserkrankungen, fibrotische Erkrankungen wie Lungenfibrose, Leberfibrose oder Nierenfibrose, Organhypertrophien und -hyperplasien, insbesondere bei Prostatahyperplasie bzw. Prostatahypertrophie verwendet werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Kombination eines NBC-Blockers der Formel I mit Natrium/Wasserstoff-Austausch (NHE)-Inhibitoren. Beide Wirkstoffklassen zeigen in der kombinierten therapeutischen Anwendung überraschenderweise

synergistische Effekte bei der Behandlung von Krankheitsbildern, die auf ischämische Zustände und Reperfusionsereignisse zurückzuführen sind. Somit sind die Kombinationen eines NBC-Inhibitors mit einem NHE-Blocker hervorragend zur Infarkt- und Reinfarktprophylaxe und der Infarktbehandlung sowie zur Behandlung

5 der angina pectoris und der Inhibierung ischämisch induzierter Herzarrhythmien, der Tachykardie und der Entstehung und Aufrechterhaltung des Kammerflimmerns geeignet, wobei die Kombinationen auch präventiv die pathophysiologischen Vorgänge beim Entstehen ischämisch induzierter Schäden inhibieren oder stark vermindern. Wegen ihrer verstärkten schützenden Wirkungen gegen pathologische

10 hypoxische und ischämische Situationen können die erfindungsgemäßen Kombinationen infolge verstärkter Inhibierung des Na^+ Einstroms in die Zelle als Arzneimittel zur Behandlung aller akuten oder chronischen, durch Ischämie ausgelösten Schäden oder dadurch primär oder sekundär induzierter Krankheiten verwendet werden. Dies betrifft ihre Verwendung als Arzneimittel für operative

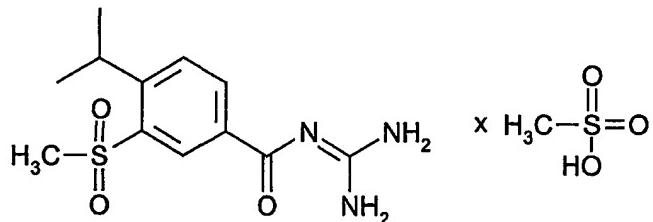
15 Eingriffe, z. B. bei Organtransplantationen, wobei die Kombinationen eines NHE-Inhibitors mit einem Blocker des nicht-inaktivierenden Natriumkanals sowohl für den Schutz der Organe im Spender vor und während der Entnahme, zum Schutz entnommener Organe beispielweise auch bei deren Lagerung in physiologischen Badflüssigkeiten, wie auch bei der Überführung in den Empfängerorganismus

20 verwendet werden können. Die Kombinationen eines NBC-Blockers der Formel I mit NHE-Inhibitoren sind ebenfalls wertvolle, protektiv wirkende Arzneimittel bei der Durchführung angioplastischer operativer Eingriffe beispielweise am Herzen wie auch an peripheren Gefäßen. Entsprechend ihrer protektiven Wirkung gegen ischämisch induzierte Schäden sind diese Kombinationen auch als Arzneimittel zur

25 Behandlung von Ischämien des Nervensystems, insbesondere des Zentralnervensystems geeignet, wobei sie zur Behandlung des Schlaganfalls oder des Hirnödems geeignet sind. Darüber hinaus eignen sich die erfindungsgemäßen Kombinationen ebenfalls zur Behandlung von Formen des Schocks, wie beispielsweise des allergischen, cardiogenen, hypovolämischen und des bakteriellen

30 Schocks.

So wurde beispielsweise überraschend gefunden, dass die Kombination des NBC-Blockers 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure mit dem NHE-Inhibitor Cariporide mesilat,



- 5 das zum Beispiel in der US-Patentschrift US 5 591 754 beschrieben ist, eine größere als additive, cardioprotektive Wirkung in einem Ischämie/Reperfusions-Modell (isoliert arbeitendes Rattenherz) zeigte.

Arzneimittel, die eine Verbindung I enthalten, können dabei oral, parenteral, 10 intravenös, rektal oder durch Inhalation appliziert werden, wobei die bevorzugte Applikation von dem jeweiligen Erscheinungsbild der Erkrankung abhängig ist. Die Verbindungen I können dabei allein oder zusammen mit galenischen Hilfsstoffen zur Anwendung kommen, und zwar sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin.

15

Welche Hilfsstoffe für die gewünschte Arzneimittelformulierung geeignet sind, ist dem Fachmann auf Grund seines Fachwissens geläufig. Neben Lösemitteln, Gelbildnern, Suppositorien-Grundlagen, Tablettenhilfsstoffen, und anderen Wirkstoffträgern können beispielsweise Antioxidantien, Dispergiermittel, 20 Emulgatoren, Entschäumer, Geschmackskorrigentien, Konservierungsmittel, Lösungsvermittler oder Farbstoffe verwendet werden.

Für eine orale Anwendungsform werden die aktiven Verbindungen mit den dafür geeigneten Zusatzstoffen, wie Trägerstoffen, Stabilisatoren oder inerten 25 Verdünnungsmittel vermischt und durch die üblichen Methoden in die geeigneten Darreichungsformen gebracht, wie Tabletten, Dragees, Steckkapseln, wässrige,

- alkoholische oder ölige Lösungen. Als inerte Träger können z. B. Gummi arabicum, Magnesia, Magnesiumcarbonat, Kaliumphosphat, Milchzucker, Glucose oder Stärke, insbesondere Maisstärke, verwendet werden. Dabei kann die Zubereitung sowohl als Trocken- als auch als Feuchtgranulat erfolgen. Als ölige Trägerstoffe oder als
- 5 Lösemittel kommen beispielsweise pflanzliche oder tierische Öle in Betracht, wie Sonnenblumenöl oder Lebertran.

Zur subkutanen oder intravenösen Applikation werden die aktiven Verbindungen, gewünschtenfalls mit den dafür üblichen Substanzen wie Lösungsvermittler,

10 Emulgatoren oder weiteren Hilfsstoffen in Lösung, Suspension oder Emulsion gebracht. Als Lösungsmittel kommen z. B. in Frage: Wasser, physiologische Kochsalzlösung oder Alkohole, z. B. Ethanol, Propanol, Glycerin, daneben auch Zuckerlösungen wie Glucose- oder Mannitlösungen, oder auch eine Mischung aus den verschiedenen genannten Lösungsmitteln.

15 Als pharmazeutische Formulierung für die Verabreichung in Form von Aerosolen oder Sprays sind geeignet z. B. Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen des Wirkstoffes der Formel I in einem pharmazeutisch unbedenklichen Lösungsmittels, wie insbesondere Ethanol oder Wasser, oder einem Gemisch solcher Lösungsmittel.

20 Die Formulierung kann nach Bedarf auch noch andere pharmazeutische Hilfsstoffe wie Tenside, Emulgatoren und Stabilisatoren sowie ein Treibgas enthalten. Eine solche Zubereitung enthält den Wirkstoff üblicherweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 10, insbesondere von etwa 0,3 bis 3 Gew.-%.

25 Die Dosierung des zu verabreichenden Wirkstoffs der Formel I und die Häufigkeit der Verabreichung hängen von der Wirkstärke und Wirkdauer der verwendeten Verbindungen ab; außerdem auch von Art und Stärke der zu behandelnden Krankheit sowie von Geschlecht, Alter, Gewicht und individueller Ansprechbarkeit

30 des zu behandelnden Säugers.

Im Durchschnitt beträgt die tägliche Dosis einer Verbindung der Formel I bei einem etwa 75 kg schweren Patienten mindestens 0,001 mg/kg, vorzugsweise 0,01 mg/kg, bis höchstens 10 mg/kg, vorzugsweise 1 mg/kg Körpergewicht. Bei akuten

- 5 Ausbrüchen der Krankheit, etwa unmittelbar nach Erleiden eines Herzinfarkts, können auch noch höhere und vor allem häufigere Dosierungen notwendig sein, z. B. bis zu 4 Einzeldosen pro Tag. Insbesondere bei i.v. Anwendung, etwa bei einem Infarktpatienten auf der Intensivstation können bis zu 200 mg pro Tag notwendig werden.

10

Experimenteller Teil

Liste der Abkürzungen:

	ACN	Acetonitril
15	HPLC	High Pressure Liqid Chromatography
	LM	Lösungsmittel
	RT	Raumtemperatur
	EE	Ethylacetat (EtOAc)
	Smp	Schmelzpunkt
20	eq.	Äquivalent
	TFA	Trifluoressigsäure
	Rt	Retentionszeit
	MS	Massenspektrometer
	dppf	1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen

25

Analytik:

HPLC 1Agilent 1100

11

Method Gradient: 10 % ACN(0.1% TFA) / 90% water (0.1% TFA) – auf

- 90 % ACN(0.1% TFA)/ 10%water(0.1% TFA) in 7 min, Fluß 2.5 mL/min

Säule: Altech RP18, 3 µm, 7 x 35 mm

MS: Waters Mass Lynx – ESI-TOF, [M-H⁺]⁻, 100% Peak, wenn nicht anders

5 angegeben

HPLC 2Agilent 1100 LC/MSD

Method Gradient: 5 % ACN(0.05% TFA) / 95% water (0.05% TFA) – auf

- 95 % ACN (0.05% TFA)/5%water (0.05% TFA) in 4 min, Fluß 0.5 mL/min

10 Säule: ESI, [M+H⁺]⁺, Merck Purospher RP18, 5 µm, 2 x 55 mm

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Anthranilsäuren (I / II)

15 Stufe 1: 1.0 eq. der 2,4-Bis-halo-5-chlorsulfonyl-benzoësäure der Formel VI löst bzw. suspendiert man in Essigsäureethylester (5 ml/mmol) und versetzt sodann mit 5 eq. Amin der Formel V. Nach Rühren über 17 Stunden bei RT wird das Reaktionsgemisch mit 2N Salzsäure auf pH 1 bis 2 angesäuert und mit EE extrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ wird das LM evaporiert und das Rohprodukt
20 ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

Stufe 2: 1.0 eq. des 2,4-Bis-halo-5-sulfamoyl-benzoësäure-Derivats der Formel IV wird mit 5 eq. Amin der Formel III versetzt und bei 100°C über 24 Stunden erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird mit 5N Zitronensäurelösung versetzt
25 und mit EE extrahiert. Die organische Phase wird konzentriert und das erhaltene Rohprodukt über präparative HPLC (RP-Gel, Laufmittel Acetonitril/Wasser-Gradient) gereinigt.

Beispiel 1: 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure,

Lysin-Salz, HPLC2: Rt = 5.252 MS: 525.20

5 Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-chloro-benzoësäure aus Reaktion von 4-Chloro-5-(chlorsulfonyl)-2-chloro-benzoësäure und 4-Fluor-3-chlorbenzylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

10 b) 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farblose Kristalle.

c) Salzbildung mit 1 eq 1 b), gelöst in Acetonitril, unter Zugabe einer wäßrigen Lösung von 1 eq D,L-Lysin. Nach Gefriertrocknung verbleibt ein farbloser Feststoff.

15

Beispiel 2: 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure,

HPLC2: Rt = 5.270 MS: 569.00

Syntheseweg:

20 a) 4-Bromo-5-(chlorsulfonyl)-2-chloro-benzoësäure aus 4-Bromo-2-chloro-benzoësäure durch Reaktion in reiner Chlorsulfonsäure (10 eq) bei 95°C innerhalb von 6h. Nach Erkalten wird auf Eis gegossen und der Niederschlag abfiltriert, farbloser Feststoff.

b) 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-chloro-benzoësäure aus 2a) nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

c) 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus b) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 3: 5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure,

HPLC2: Rt = 5.227 MS: 491.40

5 Syntheseweg:

a) 5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus 2c)
durch Hydrogenolyse mittels 10%-Pd/C-Katalysator in Ethanol bei RT über 2 Tage.
Der Katalysator wird abfiltriert und das LM abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch
präparative RP-HPLC (Wasser/ Acetonitril-Gradient), farbloser Feststoff nach

10 Gefriertrocknung.

Beispiel 4: 4-Methyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-
benzoësäure,

15 HPLC2: Rt = 5.199 MS: 505.05

Syntheseweg:

a) 4-Bromo-2-fluoro-benzoësäuremethylester aus 4-Bromo-2-fluoro-benzoësäure
durch Veresterung mit einem Überschuss an Acetylchlorid in Methanol bei RT
innerhalb 7h. Wässrige Aufarbeitung und anschließende Gefriertrocknung liefert

20 einen farblosen Feststoff.

b) 4-Methyl-2-fluoro-benzoësäuremethylester aus 1 eq 4 a) durch Reaktion mit 2 eq
Methylzink-chlorid, hergestellt aus dem entsprechendem Grignard-Reagenz in THF
und Zinkchlorid-THF-Komplex, in Gegenwart von 5mol% Pd(dppf)Cl₂ und 6mol%
CuI in THF bei RT innerhalb 18 h. Nach NH₄Cl-Aufarbeitung wird mit EE extrahiert,

25 das LM evaporiert, das Rohprodukt über präp. HPLC gereinigt und lyophilisiert,
farbloser Feststoff.

c) 4-Methyl-2-fluoro-benzoësäure aus 4 b) durch Hydrolyse mit 2N Natronlauge in
Methanol bei 50°C innerhalb einer Stunde. Anschließendes Azidifizieren mit 2N

Salzsäure, Extraktion mit EE und Trocknung über MgSO₄ ergibt ein Rohprodukt, welches in die nächste Stufe eingesetzt wird.

d) 4-Methyl-5-(chlorsulfonyl)-2-fluoro-benzoësäure aus 4 c) durch Reaktion in reiner

Chlorsulfonsäure (10 eq) bei 95°C innerhalb von 6h. Nach Erkalten wird auf Eis

5 gegossen, mit EE extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Evaporation ergibt ein gelbliches Öl, welches in dieser Reinheit weiter umgesetzt wird.

e) 4-Methyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-fluoro-benzoësäure aus 4 d) und 4-Fluor-3-chlor-benzylamin analog 1 a), farbloser Feststoff.

10 f) 4-Methyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus 4 e) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

15 Beispiel 5: 4-Isopropyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure,

HPLC2: Rt = 5.399 MS: 533.10

Syntheseweg:

a) 4-Isopropyl-2-fluoro-benzoësäuremethylester aus 1 eq 4 a) durch Reaktion mit 2

20 eq Isopropylzink-chlorid, analog zur Darstellung von 4 a), farbloser Feststoff.

b) 4-Isopropyl-2-fluoro-benzoësäure aus 5 a) durch Hydrolyse mit 2N Natronlauge, analog 4 c).

c) 4-Isopropyl-5-(chlorsulfonyl)-2-fluoro-benzoësäure aus 5 b) durch Reaktion in reiner Chlorsulfonsäure analog 4 d).

25 d) 4-Isopropyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-fluoro-benzoësäure aus 5 c) und 4-Fluor-3-chlor-benzylamin analog 1 a), farbloser Feststoff.

15

- e) 4-Isopropyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus 5 d) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

5

Beispiel 6: 4-n-Propyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure,

HPLC2: Rt = 5.437 MS: 533.10

Syntheseweg:

- 10 a) 4- n-Propyl-2-fluoro-benzoësäuremethylester aus 1 eq 4 a) durch Reaktion mit 2 eq n-Propylzink-chlorid, analog zur Darstellung von 4a), farbloser Feststoff.
- b) 4- n-Propyl-2-fluoro-benzoësäure aus 6 a) durch Hydrolyse mit 2N Natronlauge, analog 4 c).
- c) 4- n-Propyl-5-(chlorsulfonyl)-2-fluoro-benzoësäure aus 6 b) durch Reaktion in reiner Chlorsulfonsäure analog 4 d).
- 15 d) 4- n-Propyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-fluoro-benzoësäure aus 6 c) und 4-Fluor-3-chlor-benzylamin analog 1 a), farbloser Feststoff.
- e) 4- n-Propyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus 6 d) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 7: 4-(4-Methyl-phenyl)-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-Benzoësäure

25 HPLC2: Rt = 5.762 MS: 581.60

aus Reaktion von 1 eq 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure und 1.2 eq 4-Tolyl-boronsäure in einem LM-Gemisch Toluol/MeOH 2 : 1 in Gegenwart von 10 mol% Pd(OAc)₂, 20 mol%

16

Triphenylphosphin und 3 eq Natriumcarbonat unter Rückfluss für 3 Stunden.
Wässrige Aufarbeitung, anschließende préparative HPLC und Gefriertrocknung
liefert einen farblosen Feststoff.

5

Beispiel 8: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-4-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoësäure,

HPLC1: Rt = 4.417 MS: 474.1 [M+H]⁺

Syntheseweg:

- 10 a) 2,4-Dichloro-5-[(pyridin-4-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und Pyridin-4-yl-methylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.
- b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-4-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser
- 15 Feststoff.

Beispiel 9: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoësäure

- 20 HPLC1: Rt = 4.441 MS: 474.1 [M+H]⁺

Syntheseweg:

- a) 2,4-Dichloro-5-[(pyridin-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und Pyridin-2-yl-methylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

25

- b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 10: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(3-chloro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.267 MS: 505.08

5 Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 3-Chloro-benzylamin nach allg.

Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(3-chloro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus a)

10 durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 11: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(4-sulfamoyl-benzylsulfamoyl)-benzoësäure

15 HPLC1: MS: 550.13

Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(4-sulfamoyl-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 4-Sulfamoyl-benzylamin nach allg.

Vorschrift, Stufe 1.

20 b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(4-sulfamoyl-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus

a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

25 Beispiel 12: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,3-dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.368 MS: 539.06

Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(2,3-Dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 2,3-Dichloro-benzylamin nach allg.

Vorschrift, Stufe 1.

- 5 b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,3-dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus
a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschift, Stufe 2, farbloser
Feststoff.

- 10 Beispiel 13: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,4-dichloro-benzylsulfamoyl)-
benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.433 MS: 539.06

Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(2,4-Dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-

- 15 Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 2,4-Dichloro-benzylamin nach allg.
Vorschift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,4-dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus
a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschift, Stufe 2, farbloser
Feststoff.

20

Beispiel 14: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-chloro-6-fluoro-benzylsulfamoyl)-
benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.230 MS: 523.11

- 25 Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(2-chloro-6-fluoro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von
2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 2-Chloro-6-fluoro-benzylamin nach
allg. Vorschift, Stufe 1.

19

- b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-chloro-6-fluoro-benzylsulfamoyl)-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

5

Beispiel 15: 4-Chloro-5-[(5-methyl-furan-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.036 MS: 513.19

Syntheseweg:

- 10 a) 2,4-Dichloro-5-[(5-methyl-furan-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 5-Methyl-furan-2-yl-methylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.
- b) 4-Chloro-5-[(5-methyl-furan-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 16: 4-Chloro-5-[2-(4-chloro-phenyl)-ethylsulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoësäure

20 HPLC1: Rt = 5.453 MS: 519.14

Syntheseweg:

- a) 2,4-Dichloro-5-[2-(4-chloro-phenyl)-ethylsulfamoyl]-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 2-(4-Chloro-phenyl)-ethylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.
- b) 4-Chloro-5-[2-(4-chloro-phenyl)-ethylsulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 17: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-thiophen-2-yl-ethylsulfamoyl)-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.253 MS: 491.10

5 Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(2-thiophen-2-yl-ethylsulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 2-Thiophen-2-yl-ethylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

- 10 b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-thiophen-2-yl-ethylsulfamoyl)-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

15 Beispiel 18: 4-Chloro-5-(4-ethyl-phenylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.358 MS: 485.17

Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(4-ethyl-phenylsulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und 4-Ethyl-anilin nach allg. Vorschrift, Stufe

20 1.

b) 4-Chloro-5-(4-ethyl-phenylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

25 Beispiel 19: 4-Chloro-5-(phenylbutylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.511 MS: 523.11

21

aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

- 5 Beispiel 20: 4-Chloro-5-(cyclohexylmethyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.548 MS: 475.10

Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(cyclohexylmethyl-sulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-

- 10 Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoësäure und Cyclohexylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-5-(cyclohexylmethyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

15

Beispiel 21: 4-Chloro-5-(isobutyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure

HPLC1: Rt = 5.208 MS: 437.10

Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(isobutyl-sulfamoyl)-benzoësäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-

- 20 (chlorsulfonyl)-benzoësäure und Isobutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-5-(isobutyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

25 Pharmakologischer Teil:

Beschreibung der NBC-Aktivitätsmessungen:

Die meisten der molekularbiologischen Techniken folgen Protokollen aus den Werken "Current Protocols in Molecular Biology (eds. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.; John Wiley & Sons)" bzw: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.; Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))". Zunächst wurde die Herzform des humanen NBC1 durch RT-PCR kloniert. Nach Bestätigung der Sequenz wurden die entsprechenden cDNAs in den Vektor pcDNA3.1+ einkloniert, der als Selektionsmarker für eukaryote Zellen das neo-Gen enthält. Für die Amplifikation der humanen Herzform des NBC1 wurde humane Herz-mRNA (Fa. 5 Clontech, Palo Alto, CA, USA) mit Primern amplifiziert, die den Bereich abdecken, in dem sich die Herzform von der Nierenform unterscheidet. Die Herzform unterscheidet sich dabei nur am 5'-Ende der codierenden Sequenz. Der für die ersten 41 Aminosäuren der Nierenform codierende Bereich ist in der Herzform durch einen für 85 Aminosäuren codierenden Bereich ersetzt (Positionen 118 – 370 aus 10 Abukadze et al., J. Biol. Chem. 273, 17689 - 17695 (1998) bzw. Positionen 45 – 294 aus Choi et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 276, C576-C584 (1999) ersetzen Positionen 150 – 270 aus Burnham et al. (s.o.), J. Biol. Chem. 272, 19 111 - 19 114 (1997) umfassen. Das Produkt der PCR-Reaktion wurde zunächst in den Vektor 15 pCR2.1 kloniert und nach Verifizierung der Sequenz mittels durch die PCR-Reaktion eingeführter Schnittstellen in die cDNA der Nierenform des NBC1 einkloniert. Das 20 erhaltene Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf korrekten Einbau der humanen Herz NBC1-cDNA überprüft. Die erhaltenen Plasmide für die Herzform des humanen NBC1 wurden mittels des LipofectAmine™ Reagent der Firma LifeTechnologies (Gaithersburg, MD, USA) in die Zelllinie CHO K1 (Ovarzellen des Chinesischen 25 Hamsters) transfiziert, die keine messbare NBC-Aktivität aufweist. Nach Selektion auf transfizierte Zellen über Wachstum in G418-haltigem Medium (nur Zellen, die durch Transfektion ein neo-Gen erhalten haben, können unter diesen Bedingungen Überleben) wurden einzelne Zellen isoliert und kultiviert. Mit dem unten beschriebenen Test wurden am FLIPR Zellklone identifiziert, die eine deutliche NBC- 30 Aktivität aufweisen. Die besten Zelllinien wurden für die weiteren Tests verwendet und zur Vermeidung eines Verlustes der transfizierten Sequenz unter ständigem Selektionsdruck in G418-haltigem Medium kultiviert.

23

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Wirkstoffe auf die Herzform des humanen NBC1 wurde ein Test aufgebaut, der eine Weiterentwicklung des für das Testen von Inhibitoren des NCBE (Na^+ -abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) aufgebauten Assays (EP 0 903 339) auf Basis der "Acid Load" Methode (Sardet et al., Cell 56, 271 - 280 (1989); Faber et al., Cell. Physiol. Biochem. 6, 39 - 49 (1996) darstellt. In diesem Test wird die Erholung des intrazellulären pHs (pH_i) nach einer vorhergehenden Ansäuerung unter Bedingungen ermittelt, bei denen der NBC aktiv ist, die anderen pH_i regulierenden Systeme der CHO-Zellen wie NHE (Na^+/H^+ -Austauscher) und NCBE (Na^+ -abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) durch spezifische Inhibitoren aber blockiert sind. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die beobachtete Erholung des intrazellulären pH auf der Aktivität des NBC1 beruht.

Durchführung der Messungen

Am Vortag werden die transfizierten Zellen auf 96-Well Mikrotiterplatten in einer Dichte von ca. 15.000 Zellen/Well in 200 μl Wachstumsmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Der intrazelluläre pH der transfizierten Zellen mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF (Molecular Probes (Eugene, OR, USA), eingesetzt wird die Vorstufe BCECF-AM) bestimmt. Die Zellen werden zunächst mit BCECF-AM beladen. Das Wachstumsmedium der am Vortag ausgesäten Zellen wird manuell abgenommen, da das im Medium vorhandene fötale Kälberserum die BCECF-Färbung stören könnte. Zur Färbung werden zu den Zellen eines jeden Wells 100 μl NH₄Cl-Färbepuffer (20 mM NH₄Cl, 115 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 20 mMHEPES, 5 mM Glucose; pH mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt) gegeben, der 5 μM BCECF-AM enthält. Die Zellen werden 20 Minuten bei 37°C im CO₂-Brutschrank mit dieser Färbelösung inkubiert. Während dieser Zeitspanne reichern sich zum einen NH₄⁺-Ionen in den Zellen an, was eine leichte Alkalisierung hervorruft, zum anderen gelangt BCECF-AM in die Zellen, wo durch Wirkung von Esterasen der Farbstoff BCECF, der nicht zellmembranpermeabel ist, aus BCECF-AM freigesetzt wird. Zur Ansäuerung der

- Zellen werden diese anschließend im Zellwascher gründlich (dreimaliges Waschen mit einem Gesamtvolumen von 1,2 ml pro Well) mit einem Na^+ - und NH_4^+ -freien Waschpuffer gewaschen (133,8 mM Cholinchlorid, 4,7 mM KCl, 1,25 mM CaCl_2 , 1,25 mM MgCl_2 , 0,97 mM K_2HPO_4 , 0,23 mM KH_2PO_4 , 5 mM HEPES, 5 mM Glucose; pH mit 1 M KOH auf 7,4 eingestellt). Dieser Waschschritt führt zu einem drastischen Abfall des intrazellulären pHs (~6,3-6,4). Da der Waschpuffer aber weder Natrium- noch Bicarbonationen enthält, sind die Zellen nicht in der Lage ihren intrazellulären pH zu regulieren. Die eigentliche Messung der intrazellulären pH-Erholung findet im sogenannten FLIPR (Fluorescence Imaging Plate Reader) der Firma Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) statt. Der FLIPR besitzt einen Argonlaser, dessen 488 nm Bande sich sehr gut zur Anregung des BCECFs eignet. Durch eine komplizierte Strahlenführung wird erreicht, dass alle 96 Wells einer Mikrotiterplatte gleichzeitig angeregt und somit gleichzeitig gemessen werden können. Durch die besondere Konstruktionsweise des FLIPRs werden nur die unteren 50 μm in jedem Well angeregt, weshalb man bevorzugt mit adhärenten Zellen wie z.B. CHO arbeitet. Das von den angeregten Zellen emittierte Licht gelangt zunächst über einen Filter, der zwischen 510 und 570 nm durchlässig ist, und wird dann mittels einer CCD-Kamera registriert. Da der FLIPR auch einen eingebauten 96-Spitzen-Pipettor enthält, kann man in alle 96 Wells einer Mikrotiterplatte gleichzeitig das gleiche Volumen einer beliebigen Flüssigkeit pipettieren. Etwa jede Sekunde kann man eine Gesamtmeßung einer vollständigen Mikrotiterplatte durchführen. Im FLIPR wird zu den nach dem Waschen angesäuerten Zellen jeweils 180 μl Substanzpuffer (90 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , 25 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0,8 mM K_2HPO_4 , 0,2 mM KH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 5 mM Glucose; am Tag der Messung wird 5 Sekunden reines CO_2 durchgeleitet und der pH anschließend mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt; das CO_2 -Durchleiten kann aber auch entfallen, ohne dass sich die Messergebnisse merkbar ändern) hinzupipettiert. Um die unter diesen Pufferbedingungen ebenfalls aktiven pH-Regulationssysteme NHE und NCBE zu hemmen, enthält der Substanzpuffer zusätzlich noch spezifische Inhibitoren dieser Austauscher. Die Endkonzentration des NHE-Inhibitors Cariporide mesilat (EP 589 336) beträgt 10 μM , die des NBCE-Inhibitors nach EP 855 392

25

Beispiel 1: 2-Butyl-5-methylsulfanyl-3-(2'-cyanaminosulfonyl-biphenyl-4-ylmethyl)-3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester 30 µM. Nach Zugabe von Substanzpuffer steigt der intrazelluläre pH der zuvor angesäuerten Zellen durch die Aktivität des NBC an, was sich in einer Fluoreszenzzunahme des pH- sensitiven Farbstoffes bemerkbar macht.

- Die inhibitorische Wirkung einer Substanz wird nun bestimmt, indem man den Fluoreszenzanstieg, der sich linear zum pH-Anstieg verhält, unter Einfluss dieser Substanz mit dem von Wells vergleicht, bei denen der NBC ungehemmt ist [100% Aktivität, nur Zugabe von Cariporide mesilat und des NCBE- Blockers nach EP 855 10 392. Beispiel 1] bzw. völlig gehemmt ist [0% Aktivität, neben Cariporide mesilat und NCBE-Blocker nach EP 855 392, Bsp. 1, noch Zugabe von 400 µM DCDPC, 4-Chloro-2-(3-chloro-phenylamino)-benzoësäure].

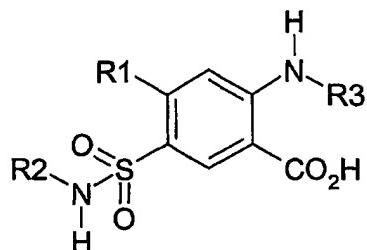
- Die gesamte Messung einer Mikrotiterplatte dauert zwei Minuten, wobei die gesamte 15 Platte alle 2 Sekunden gemessen wird. Nach den ersten 5 Messungen werden die jeweils 180 µl Substanzpuffer, die die zu testenden Verbindungen enthalten, mit einer Geschwindigkeit von 60 µl pro Sekunde zu den angesäuerten Zellen pipettiert. Nach wenigen Sekunden bereits zeigt sich in Wells, in denen der NBC nicht gehemmt wird, eine deutliche Fluoreszenzzunahme. Der Bereich zwischen 20 und 20 80 Sekunden, in dem die Fluoreszenzzunahme in den Positivkontrollen linear verläuft, wird zur Berechnung der verbleibenden NBC-Aktivität betrachtet. Von den 96 Wells der Mikrotiterplatte werden jeweils 8 für den 100%- bzw. den 0%-Wert verwendet.

- Die folgenden Daten beziehen sich auf die Restaktivität bei einer Inhibitor- 25 Konzentration von 10µM und sind Resultat von Doppelbestimmungen. .

Ergebnisse:		26 [%] at 10µM
Beispiel	1	46
	2	56
	3	88
5	4	54
	5	78
	6	69
	7	95
	8	89
10	9	89
	10	75
	11	81
	12	37
	13	60
15	14	87
	15	79
	16	91
	17	95
	18	79
20	19	77
	20	89
	21	94

Patentansprüche

1. Anthranilsäuren der Formel I



5 worin bedeuten:

R(1) H, Cl, Br, I, CN, (C₁-C₈)- Alkyl, (C₃-C₆)- Cycloalkyl oder Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, (C₁-C₃)- Alkyl, Methoxy oder -(CF₂)_a-CF₃;

10 a Null, 1, 2 oder 3;

R(2) (C₁-C₈)- Alkyl, -C_bH_{2b}- (C₃-C₆)- Cycloalkyl, -C_bH_{2b}- Phenyl, -C_bH_{2b}- Pyridinyl, -C_bH_{2b}- Thiophenyl, -C_bH_{2b}- Furanyl,

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl,

15 Methoxy oder -SO₂NR(4)R(5);

R(4) und R(5) unabhängig voneinander H, (C₁-C₄)-Alkyl,

b Null, 1, 2, 3 oder 4;

R(3) -C_dH_{2d}- Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-

20 3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder

Methoxy;

d 3 oder 4;

sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

2. Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1, in denen bedeuten:

R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

R(2) (C₁-C₄)- Alkyl, -C_bH_{2b}- Cyclohexyl, -C_bH_{2b}- Phenyl, -C_bH_{2b}- Pyridinyl, -C_bH_{2b}- Thiophenyl, -C_bH_{2b}- Furanyl,

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl, Methoxy oder -SO₂NH₂;

b Null, 1 oder 2;

R(3) -n-C₄H₈- Phenyl,

wobei das Phenyl unsubstituiert ist oder substituiert mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

sowie deren pharmazeutische verträgliche Salze.

3. Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass darin bedeuten:

R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl;

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

R(2) (C₁-C₄)- Alkyl, -C_bH_{2b}- Cyclohexyl, -C_bH_{2b}- Phenyl, -C_bH_{2b}- Pyridinyl, -C_bH_{2b}- Thiophenyl, -C_bH_{2b}- Furanyl;

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl, Methoxy oder -SO₂NH₂;

b 1;

R(3) -n-C₄H₈- Phenyl,

sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

4. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie 4-Chloro-5-(3-

5 chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoësäure ist;

sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze.

5. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Arrhythmien.

10

6. Methode zum Behandeln von Arrhythmien, dadurch gekennzeichnet, dass man eine wirksame Menge einer Verbindung I nach Anspruch 1 mit den üblichen Zusatzstoffen versetzt und in einer geeigneten Darreichungsform verabreicht.

15

7. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe des Herzinfarkts.

20

8. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe der Angina Pectoris.

9. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von ischämischen Zuständen des Herzens.

25

10. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von ischämischen Zuständen des peripheren und zentralen Nervensystems und des Schlaganfalls.

30

11. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von ischämischen Zuständen peripherer Organe und Gliedmaßen.
- 5 12. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Schockzuständen.
- 10 13. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zum Einsatz bei chirurgischen Operationen und Organtransplantationen.
- 15 14. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Konservierung und Lagerung von Transplantaten für chirurgische Maßnahmen.
- 20 15. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch I zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheiten, bei denen die Zellproliferation eine primäre oder sekundäre Ursache darstellt
- 25 16. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von Störungen des Fettstoffwechsels.
17. Heilmittel, enthaltend eine wirksame Menge einer Verbindung I nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr Application No
PCT/EP 01/13681

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C07C311/39 C07D213/42 C07D307/52 C07D333/20 A61K31/18
 A61P9/10 A61P25/28 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C07C C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BEILSTEIN Data, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 726 250 A (HOECHST) 14 August 1996 (1996-08-14) page 3; claims ---	1,5-7,9, 12,17
A	EP 0 604 852 A (HOECHST) 6 July 1994 (1994-07-06) page 3; claims ---	1,5-9, 15,17
A	DE 18 02 208 A (HOECHST) 14 May 1970 (1970-05-14) cited in the application page 1; examples ---	1,17
A	US 3 565 920 A (L.H. WERNER) 23 February 1971 (1971-02-23) cited in the application column 3; examples -----	1,17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

27 March 2002

05/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

English, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nation on patent family members

Intern PCT/EP	Application No 01/13681
------------------	----------------------------

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0726250	A	14-08-1996	DE 19504379 A1 AT 197291 T AU 700883 B2 AU 4442996 A BR 9600370 A CA 2169219 A1 CN 1137519 A ,B CZ 9600382 A3 DE 59606062 D1 DK 726250 T3 EP 0726250 A1 ES 2152440 T3 FI 960587 A HR 960063 A1 HU 73975 A2 JP 8245553 A NO 960529 A NZ 280954 A PL 312531 A1 PT 726250 T RU 2155750 C2 SI 9600040 A ,B SK 17596 A3 TR 960747 A2 TW 419457 B US 5607976 A ZA 9601050 A	14-08-1996 15-11-2000 14-01-1999 22-08-1996 03-03-1998 11-08-1996 11-12-1996 14-08-1996 07-12-2000 08-01-2001 14-08-1996 01-02-2001 11-08-1996 31-10-1997 28-10-1996 24-09-1996 12-08-1996 28-10-1996 19-08-1996 30-03-2001 10-09-2000 31-10-1996 01-10-1996 21-08-1996 21-01-2001 04-03-1997 29-08-1996
EP 0604852	A	06-07-1994	AU 5271693 A CA 2112194 A1 EP 0604852 A1 FI 935825 A JP 6234730 A NO 934836 A	07-07-1994 29-06-1994 06-07-1994 29-06-1994 23-08-1994 29-06-1994
DE 1802208	A	14-05-1970	DE 1802208 A1 BE 740088 A ES 372003 A1 FR 2068542 A1 NL 6913768 A	14-05-1970 10-04-1970 16-01-1972 27-08-1971 14-04-1970
US 3565920	A	23-02-1971	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. - Aktenzeichen
PCT/EP 01/13681

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07C311/39 C07D213/42 C07D307/52 C07D333/20 A61K31/18
 A61P9/10 A61P25/28 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C07C C07D A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwandte Suchbegriffe)

BEILSTEIN Data, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 726 250 A (HOECHST) 14. August 1996 (1996-08-14) Seite 3; Ansprüche ---	1,5-7,9, 12,17
A	EP 0 604 852 A (HOECHST) 6. Juli 1994 (1994-07-06) Seite 3; Ansprüche ---	1,5-9, 15,17
A	DE 18 02 208 A (HOECHST) 14. Mai 1970 (1970-05-14) in der Anmeldung erwähnt Seite 1; Beispiele ---	1,17
A	US 3 565 920 A (L.H. WERNER) 23. Februar 1971 (1971-02-23) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3; Beispiele -----	1,17

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
27. März 2002	05/04/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter English, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, zur selben Patentfamilie gehören

Intern:	3 Aktenzeichen
PCT/EP 01/13681	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0726250	A	14-08-1996	DE	19504379 A1		14-08-1996
			AT	197291 T		15-11-2000
			AU	700883 B2		14-01-1999
			AU	4442996 A		22-08-1996
			BR	9600370 A		03-03-1998
			CA	2169219 A1		11-08-1996
			CN	1137519 A ,B		11-12-1996
			CZ	9600382 A3		14-08-1996
			DE	59606062 D1		07-12-2000
			DK	726250 T3		08-01-2001
			EP	0726250 A1		14-08-1996
			ES	2152440 T3		01-02-2001
			FI	960587 A		11-08-1996
			HR	960063 A1		31-10-1997
			HU	73975 A2		28-10-1996
			JP	8245553 A		24-09-1996
			NO	960529. A		12-08-1996
			NZ	280954 A		28-10-1996
			PL	312531 A1		19-08-1996
			PT	726250 T		30-03-2001
			RU	2155750 C2		10-09-2000
			SI	9600040 A ,B		31-10-1996
			SK	17596 A3		01-10-1996
			TR	960747 A2		21-08-1996
			TW	419457 B		21-01-2001
			US	5607976 A		04-03-1997
			ZA	9601050 A		29-08-1996
EP 0604852	A	06-07-1994	AU	5271693 A		07-07-1994
			CA	2112194 A1		29-06-1994
			EP	0604852 A1		06-07-1994
			FI	935825 A		29-06-1994
			JP	6234730 A		23-08-1994
			NO	934836 A		29-06-1994
DE 1802208	A	14-05-1970	DE	1802208 A1		14-05-1970
			BE	740088 A		10-04-1970
			ES	372003 A1		16-01-1972
			FR	2068542 A1		27-08-1971
			NL	6913768 A		14-04-1970
US 3565920	A	23-02-1971		KEINE		